

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Michal Paluba

Neuroprotektivní versus apoptický účinek morfinu

Neuroprotective versus apoptotic effect of morphine

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.

Praha, 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Neuroprotektivní versus apoptický účinek morfinu vypracoval pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne 10. 8. 2020

.....
Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a ohromnou vstřícnost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěl poděkovat mé mamince a babičce za jejich neutuchající podporu.

Abstrakt

Morfin, jež se v lékařství primárně používá jako silné analgetikum, je již po delší dobu zkoumán pro jeho protektivní účinky na neurální tkáň. Morfin prokazuje svou neuroprotektivní roli při ischemických poruchách, poněvadž u neuronů navozuje vyšší toleranci k deprivaci glukózou a kyslíkem. Morfin však nepůsobí protektivně jen na neurony, ale i na neuroglie, a to zejména pak na astrocyty. Při patologických poruchách může docházet k nadměrnému uvolňování neurotransmiterů, mezi něž patří i glutamát, který je při nadměrné koncentraci znám pro svoji excitotoxicitu. Morfin i v tomto případě účinně blokuje efekt glutamátu a zabraňuje tak apoptóze buněk. Existují však i důkazy o apoptickém efektu morfinu na buňky, jelikož v některých případech zvyšuje syntézu a aktivitu proapoptických faktorů. Apoptický efekt morfinu však nemusí působit na organismus vždy jen negativně. Existují i důkazy o jeho účinku na regulaci vývoje nádorů, pomocí morfinem indukované apoptózy.

Klíčová slova

morfin, neuroprotektce, apoptóza, excitotoxicita, ischemie

Abstract

Morphine, which is primarily used in medicine as a strong analgesic, has been studied for a long amount of time for its protective effects on neural tissue. Morphine demonstrates its neuroprotective role in ischemic disorders because it induces a higher tolerance to glucose and oxygen deprivation among neurons. However, morphine has a protective influence not only on neurons, but also on neuroglia, especially on astrocytes. Pathological disorders can result in the over-release of neurotransmitters, which include glutamate, which is known for its excitotoxicity at excessive concentration. Morphine even in this case effectively blocks the effect of glutamate, thus preventing apoptosis of cells. However, there is also evidence of an apoptotic effect of morphine on cells, as in some cases it increases the synthesis and activity of proapoptotic factors. However, the apoptotic effect of morphine does not always affect the organism only negatively. There is also evidence of its effect on the regulation of the tumour development by using morphine-induced apoptosis.

Keywords

morphine, neuroprotection, apoptosis, excitotoxicity, ischemia

Seznam použitých zkratk

3'-UTR	-	3' nepřekládaný region
Ach	-	acetylcholin
AchE	-	acetylcholinesteráza
Akt	-	proteinkináza B
APP	-	prekurzor amyloidního proteinu
ATF6	-	aktivační transkripční faktor 6
ATP	-	adenosintrifosfát
A β	-	beta-amyloid
Bak	-	Bcl-2 homologní antagonista/vrah
Bax	-	Bcl-2 asociovaný X protein
Bcl	-	lymfom B buněk
Bcl-2	-	lymfom B buněk 2
Bcl-x _L	-	lymfom B buněk - velmi velký
Ca ²⁺	-	vápenatý ion
CAMK	-	Ca ²⁺ /calmodulin dependentní proteinkináza
CAMKII α	-	Ca ²⁺ /calmodulin dependentní proteinkináza II alfa
cAMP	-	cyklický adenosinmonofosfát
DAG	-	1,2-diacylglycerol
DALDA	-	Tyr-Arg-Phe-Lys-NH ₂
DAMGO	-	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkefalin
DiPOA	-	[8-(3,3-difenyl-propyl)-4-oxo-1-fenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-3-yl]- acetylová kyselina
DNA	-	deoxyribonukleová kyselina
EL	-	extracelulární smyčka

ERK	-	extracelulárním signálem regulovaná kináza
GABA	-	kyselina gama-aminomáselná
GIRK	-	dovnitř usměřující draslíkové kanály spřažené s G-proteiny
GPCR	-	receptory spřažené s G-proteiny
GRK	-	kinázy receptorů spřažených s G-proteinem
GSH	-	glutathion
H ₂ O ₂	-	peroxid vodíku
CHOP	-	C/EBP homologní protein
IL	-	intracelulární smyčka
IP ₃	-	inositol-1,4,5-trisfosfát
IQMF-4	-	N-[1-fenylpyrazol-3-yl]-N-[1-(2-fenethyl)-4-piperidyl]] propenamid
K ⁺	-	draselný ion
LPS	-	lipopolysacharid
MAPK	-	mitogenem aktivovaná protein kináza
MCAO	-	okluze arterie středního mozku
MDM2	-	E3 ubiquitin-protein ligáza Mdm2
miRNA	-	mikroRNA
mRNA	-	messengerová RNA
NADPH	-	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NE	-	noradrenalin
NMDA	-	N-metyl-D-aspartátový receptor
NO	-	oxid dusný
nPKCε	-	proteinkináza C epsilon
OGD	-	deprivace kyslíkem a glukózou
PKA	-	proteinkináza A

PBL	-	periferní krevní lymfocyty
PI ₃ K	-	fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	-	proteinkináza C
PLC	-	fosfolipáza C
RNA	-	ribonukleová kyselina
ROS	-	reaktivní formy kyslíku
Tan-67	-	3-[(4aS,12aR)-2-metyl-1,3,4,5,12,12a-hexahydropyrido[3,4-b]acridin-4a-yl]fenol
TM	-	transmembránový helix
TNF	-	tumor nekrotizující faktor
UPR	-	odpověď na nesbalené proteiny
β-FNA	-	beta-funaltrexamin

Obsah

Úvod	8
Morfin – stručná historie, použití a vedlejší účinky	8
Základní mechanismy působení morfinu	9
Opioidní receptory	9
Antinociceptivní účinky morfinu	13
Neuroprotektivní účinky morfinu	14
Protektivní účinky morfinu na neurony při ischemii – morfinová prekondice	14
Protektivní účinky morfinu u neuroglií se zaměřením na astrocyty	18
Další neuroprotektivní účinky morfinu	20
Apoptické účinky morfinu	20
Neurotoxické účinky morfinu – proapoptické faktory	20
Knock-out μ -opioidních receptorů – zvýšená neurogeneze	22
Morfin a regulace vývoje nádoru	23
Závěr	25
Použitá literatura	26

Úvod

Morfin – stručná historie, použití a vedlejší účinky

Morfin ($C_{17}H_{14}NO_3$), který kvůli svému pentacyklickému jádru řadíme mezi benzyloisoquinolinové alkaloidy ^{1,2}, je účinnou složkou opia. Důkazy o užívání opia se datují již do doby před 8000 lety, tedy do dob starověkých civilizací jako starověká Římská říše, Egypt, Indie, Čína a také antické Řecko, kde bylo opia hojně využíváno ³⁻⁷. Není tak právě překvapením, že slovo pro opium pochází právě z řeckého výrazu ὀπός ([opós]; v překladu „rostlinná šťáva“), odkazující na bílou tekutinu (tzv. latex), získávanou z nezralých makovic *Papaver somniferum* ⁸.

Není jisté, kdy se opium začalo používat k léčebným účelům, ale díky svým analgetickým účinkům se využívalo hlavně k tišení bolesti. Opium však sloužilo i k vyvolání pocitů rozkoše, což jen umocňovalo cestu k vytvoření závislosti ^{7,9}.

Jak se Michael J. Brownstein ¹⁰ zmiňuje ve své práci o objevu morfinu ¹¹, „k objevu účinné látky obsažené v opiu, přispěl až v roce 1805 německý lékárník Friedrich Wilhelm Adam Sertürner“ ^{11 dle 10}. Izolovaný bílý krystalický prášek nazval „morfium“, po řeckém bohu snů Morfeovi ^{11 dle 10}. Sertürnerův objev byl však akademickou obcí ignorován, až do chvíle, kdy si ho všiml francouzský chemik J.L. Gay-Lussac, který morfium přejmenoval na morfin, jenž je tak nazýván dodnes. S jeho pomocí byly konečně roku 1817 zveřejněny poznatky o účincích morfinu ¹².

Po roce 1820 se tak morfin začal v lékařských kruzích hojně využívat k tlumení bolestí nejrůznějšího původu. Významného nárůstu v používání morfinu došlo v roce 1850, díky práci Charlese-Gabriela Pravaze a Alexandra Wooda, vynálezem tzv. „hypodermické jehly“ ³.

Díky svým analgetickým účinkům je i dnes morfin považován za tzv. „zlatý standart“ v potlačování bolesti různého původu (zejména nádorové bolesti), jež doporučuje i Světová zdravotnická organizace ¹³⁻¹⁵. Použití morfinu má však i dnes svá úskalí a omezení. K vedlejším efektům léčby morfinem, jenž se projevují v častých případech, patří např. nauzea a zvracení (projev v 70% případů) ¹⁶⁻¹⁸; konstipace (v 50% případů) ^{18,19} a sedace ²⁰⁻²⁴. Méně časté, ale o to závažnější jsou např. deprese respiračního centra ²⁵, hyperalgie či allodynie ²³⁻²⁵, myoklonus ²⁶ a halucinace ²⁷⁻³⁰. Další nevýhodou užití morfinu je vznik tolerance a závislosti.

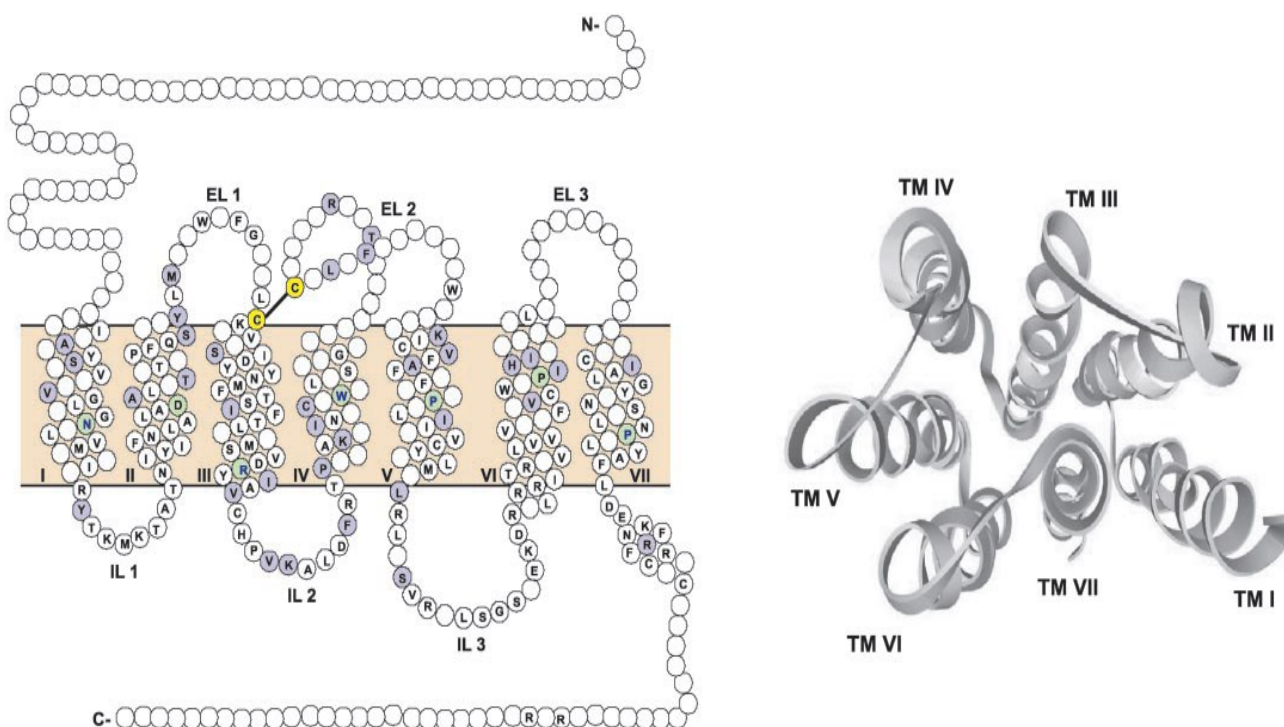
Nejnovější výzkumy zabývající se účinky morfinu stále více zdůrazňují i jeho možné neuroprotektivní a kardioprotektivní účinky. Na druhé straně se však poukazuje i na jeho možné apoptické účinky, imunosupresivní účinky či možné proliferační účinky na rakovinné buňky. Cílem této práce je shrnout právě tyto nové poznatky o protektivních a apoptických účincích morfinu.

Základní mechanismy působení morfinu

Opioidní receptory

Jsou to právě opioidní receptory, které jsou hlavními receptory pro endogenní opioidní peptidy, jako enkefaliny, endorfiny, dynorfiny, endomorfiny či neoendorfin ³¹. Jsou zároveň aktivovány i exogenními opioidy jejímž zástupcem je právě morfin ³².

Receptory jsou exprimovány na buněčných membránách různých buněk, zvláště pak na centrálních, ale i periferních neuronech. Dále se vyskytují na plazmatických membránách neuroendokrinních, imunitních a entodermálních buněk ^{33,34}. Z pohledu orgánových soustav je jejich nejhojnější zastoupení v nervové soustavě ^{35,36}, avšak můžeme je detekovat i v dalších orgánech jako jsou srdce, plíce, játra, gastrointestinální trakt či v reprodukčních orgánech ^{37,38}. Exprese a rozložení těchto receptorů je však mezi orgány a hlavně i mezi různými živočišnými druhy vysoce variabilní a je tedy nutno velmi obezřetně volit modelové organismy pro výzkum funkce receptorů ³⁹. Opioidní receptory řadíme do třídy A (tzv. Rhodopsinové rodiny) receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Konkrétně jsou opioidní receptory spřažené s $G_{i/o}$ -proteiny. Struktura receptorů sestává z extracelulární N-terminální domény, sedmi transmembránových α -helixů propojených třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami a intracelulárního C-konce, který případně může vytvořit čtvrtou intracelulární smyčku ^{40,41} (obr. č. 1). Ve struktuře opioidních receptorů se však vyskytují rozdíly, díky nimž se receptory liší v preferenci vazby k různým ligandům. Podle vazby různých ligandů pak dělíme opioidní receptory do tří hlavních subtypů.



Obrázek č. 1 Struktura opioidních receptorů

(vlevo) Serpentinový model opioidního receptoru. Každý transmembránový helix (TM) je označen římskou číslicí. Bílé prázdné kruhy představují nekonzervované aminokyseliny mezi subtypy opioidních receptorů. Bílé kruhy s písmenem představují identické aminokyseliny mezi subtypy opioidních receptorů. Fialové kruhy představují rozdílné aminokyseliny mezi receptory. Zelené kruhy zvýrazňují vysoce konzervovaná rezidua receptorů třídy A (Asn I:18 v TM1, AspII:10 v TM2, CysIII:01 v TM3, TrpIV:10 v TM4, ProV:16 v TM5, ProVI:15 v TM6, a ProVII:17 v TM7). Žluté kruhy znázorňují dva konzervované cysteiny v extracelulárních smyčkách (EL) 1 a 2, které pravděpodobně tvoří disulfidový můstek. Intracelulární smyčky (IL).

(vpravo) Navrhované uspořádání sedmi transmembránových helixů opioidních receptorů při pohledu shora (extracelulární strana). Sedm transmembránových helixů je uspořádáno postupně proti směru hodinových ručiček. Každý transmembránová helix je označen římskou číslicí.

(převzato a upraveno podle ⁴²)

Na tomto rozdělení se významně zasloužila pionýrská práce Billa Martina a jeho kolegů ⁴³, kteří rozlišili tři subtypy opioidních receptorů podle preferencí k různým ligandům: μ -opioidní receptory (kvůli preferenci k morfinu), κ -opioidní receptory (díky preferenci ke ketocyklazocinu) a δ -opioidní receptory (protože byli byly prvně objeveny ve vasa deferens u myšího modelu ⁴⁴, preferující vazbu N-allylnormetazocinu (SKF-10047)) ⁴³ (tab. č. 1). Všechny tyto různé subtypy receptorů mají afinitu k morfinu, avšak μ -opioidní receptor z nich vykazuje tu nejvyšší ⁴³. Opioidní receptory váží morfin díky jeho funkční hydroxylové skupině, jenž se váže do vazebné „kapsy“ receptoru pro ligand na extracelulární straně. Struktura této kapsy je tvořena intrahelikálním konzervovaným regionem, který sdílí všechny opioidní receptory, a tudíž mají i stejnou základní vazebnou afinitu.

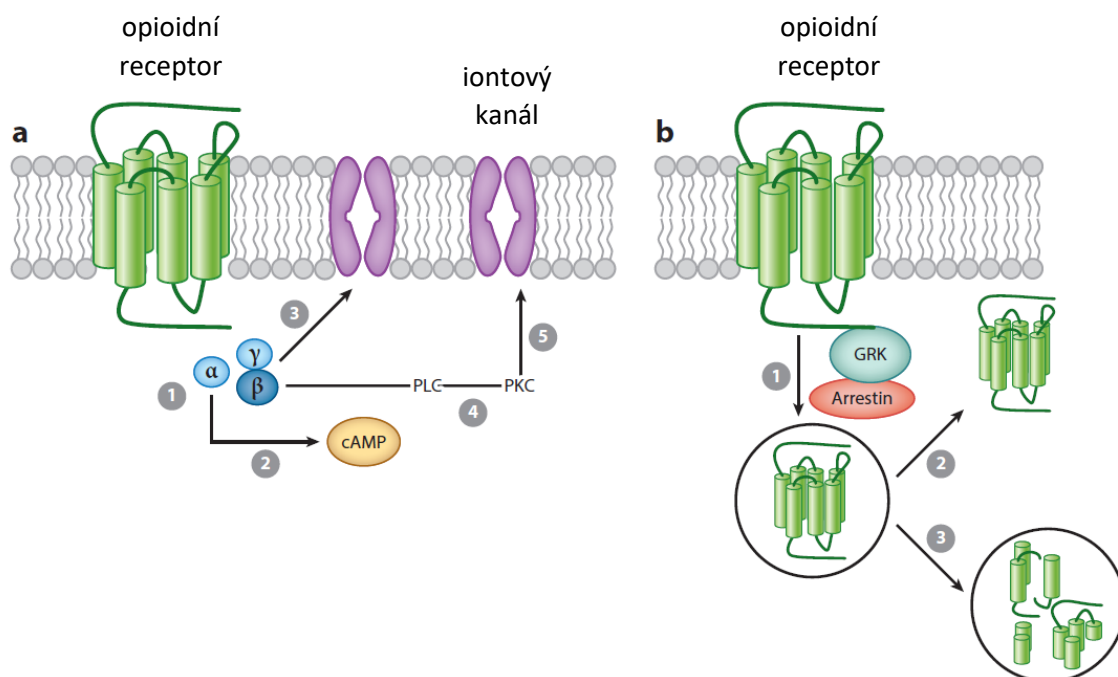
Tabulka č. 1 Subtypy opioidních receptorů a jejich ligandy

opioidní receptor	místo účinku	účinek	agonista	antagonista
μ	systémové	analgezie, eufórie, zácpa, respirační deprese	DAMGO, morfin, fentanyl, endomorfiny, β -endorfin	CTOP, naloxon
	periferní	analgezie, zácpa, redukce zánětu	DiPOA, HS731/AS006, loperamid, frakefamid, DALDA, morfin-6-glukuronid, IQMF-4, SS620	alvimopan, naloxon methiodid, methylnaltrexon
δ	systémové	analgezie, křeče, úzkost	DPDPE, SNC 80, ekefaliny, deltropin, β -endorfin, SKF-10047	naltrindol; ICI 174,864; naloxon
	periferní	analgezie, zácpa	UK-321,130; ADL5747; ADL5859; JNJ-20788560	naloxon methiodid
κ	systémové	analgezie, diuréza, dysfórie	U-69593; U50,488; bremazocin; dinorfin; ketocyklazocin	norbinaltorfimin, naloxon
	periferní	analgezie, redukce zánětu	asimadolin, FE200665/CR845, ADL10-0101, CJC-1008, ICI204448	naloxon methiodid

(převzato a upraveno podle ⁴⁵⁾)

Část vazebné kapsy je ještě překryta extracelulárními smyčkami, jež vykazují mezi subtypy určité strukturní rozdíly. Právě tyto smyčky spolu s extracelulárními konci transmembránových segmentů jsou zodpovědné za rozdílnou afinitu a selektivitu receptorů k jednotlivým ligandům a tedy i k morfinu ^{46–50}. K aktivaci receptorů dochází po navázání ligandu, což způsobí změny v konformaci receptoru, které umožní, aby se intracelulární C-konec a části smyček receptoru propojily s $G_{i/o}$ pertusis sensitivním G-proteinem. Tento heterotrimerický G-protein se za výměny GDP za GTP aktivuje a následně rozpadne na singletovou G_α podjednotku a komplex podjednotek $G_{\beta\gamma}$. G_α podjednotka pak

svou vazbou inhibuje aktivitu adenylcyklázy produkující cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) ⁵¹, zatímco $G_{\beta\gamma}$ komplex přímo ovlivňuje různé iontové kanály na plazmatické membráně ^{52,53} (obr. č. 2a).



Obrázek č. 2 Signalizace a recyklace opioidních receptorů

- (a) Agonisté opioidních receptorů indukují konformační změnu receptoru, která umožňuje jeho spojení s G-proteinem. Heterotrimerní G-protein disociuje na podjednotky G_{α} a $G_{\beta\gamma}$ ①. G_{α} inhibuje aktivitu adenylcyklázy a tím redukuje množství cAMP ②. $G_{\beta\gamma}$ snižuje propustnost napětově řízených Ca^{2+} kanálů nebo otevírá GIRK ③. Kromě toho může být aktivována dráha fosfolipázy C/proteinkinázy C ④ k modulaci aktivity Ca^{2+} kanálů v plazmatické membráně ⑤.
- (b) Desenzitizace opioidních receptorů je aktivována kinázou receptorů spřažených s G-proteinem (GRK). Po vazbě β -arrestinu je receptor v desenzitizovaném stavu na plazmatické membráně ①. Receptory s navázaným β -arrestinem pak mohou být internalizovány cestou závislou na klatrinu a buď recyklovány na povrch buňky ②, nebo degradovány v lysosomech ③

(převzato a upraveno podle ⁴⁵)

V širším pohledu můžeme považovat jako obecnou funkci opioidních receptorů inhibici neurální aktivity ve smyslu snižování excitability neuronů a snižování uvolnění neurotransmiterů do synaptických štěrbin ⁵¹. Právě interakce mezi uvolněným komplexem $G_{\beta\gamma}$ a iontovými kanály je zodpovědná za snížení neuronální aktivity. Presynapticky komplex $G_{\beta\gamma}$ inhibuje napětím řízený vápenatý (Ca^{2+}) kanál a tím snižuje influx Ca^{2+} iontů do presynaptického zakončení při depolarizaci presynaptické membrány. Snižuje se tak kalcium-dependentní fúze váčků s neurotransmitery a jejich následné vylití do synaptické štěrbin ^{45,52,54,55} (obr. č. 2a).

Dalším způsobem regulace neuronální aktivity komplexem $G_{\beta\gamma}$ je snížení možnosti vzniku excitačního postsynaptického potenciálu a zabránění tak vedení vzruchu. Interakce komplexu $G_{\beta\gamma}$ s dovnitř usměrňujícími draslíkovými kanály spřaženými s G-proteinem (GIRK) na postsynaptické membráně^{34,53,56}, vede k jejich otevření. Otevřením těchto kanálů dochází na postsynaptické membráně k hyperpolarizaci, která potlačuje vedení vzruchu^{45,53,54}.

Na pre- a postsynaptické inhibici přenosu akčního potenciálu se podílí i již zmíněná G_{α} podjednotka, interagující s adenylcyklázou, kterou inhibuje. Dochází tak ke snížení produkce cAMP. cAMP slouží jako druhý posel, který po svém navázání na proteinkinázu A (PKA) (serin/threoninová kináza) ji aktivuje. Při snížené produkci cAMP je PKA méně aktivní a není pak schopná fosforylovat různé proteiny či iontové kanály, jež jsou její fosforylací aktivovány či inaktivovány. Morfin tak sníženou hladinou cAMP a následnou nižší aktivitou PKA přispívá k inhibici přenosu akčního potenciálu⁵¹.

K dalším regulacím pak můžeme přidat ještě inhibici (1) kanálů pro sodné (Na^{+}) ionty, (2) hyperpolarizací aktivovaných cyklickými nukleotidy řízených kanálů (HCN), (3) vaniloidního receptoru TRPV1 a také iontových kanálů citlivých ke kyselému prostředí (ASIC) ve spinálních gangliích, stejně jako excitačních postsynaptických glutamátových receptorů v míše^{57–61}. Celá tato kaskáda dějů snižuje přenos nociceptivních signálů, což vede k silným analgetickým účinkům na organismus, jež započalo navázáním morfinu na opioidní receptory.

Po aktivaci receptorů dochází následně i k jejich desenzitizaci. Obecně je to u opioidních receptorů započato fosforylací intracelulárních segmentů různými kinázami. Hlavními kinázami jsou tzv. kinázy receptorů spřažených s G-proteinem (GRK), které fosforylací intracelulárních segmentů opioidních receptorů umožní vazbu β -arrestinu na opioidní receptory^{42,62}. Vazba mezi receptorem a β -arrestinem vede k tomu, že se G-protein již není schopen navázat na receptor. Následně pak dochází k internalizaci receptoru přes klatrin-dependentní cestu. Internalizovaný receptor má pak dva osudy. První možnost je recyklace receptoru a jeho opětovná reintegrace do plazmatické membrány. Druhou možností je jeho degradace v lysozomu⁴⁵ (obr. č. 2b).

Antinociceptivní účinky morfinu

Nocicepci můžeme charakterizovat jako zaznamenání silného mechanického, tepelného nebo chemického podnětu pomocí subpopulace specializovaných periferních nervových buněk zvaných nociceptory⁶³. Signály z nociceptorů putují dvěma hlavními typy vláken. (1) myelinizovanými vlákny středního průměru $A\delta$, které zprostředkovávají akutní bolest (tzv. „první“ či rychlou bolest) lokalizovanou na specifickém místě. Tyto vlákna se liší od vláken širokého průměru typu $A\beta$, jež reagují na neškodný mechanický stimul (např. jemný dotyk). (2) Nemyelinizovanými vlákny úzkého průměru

typu C, která převádí špatně lokalizovatelnou bolest (tzv. „druhou“ či pomalou bolest) ⁶⁴. Veškeré signály z těchto vláken pak putují do míchy, která je pak přes dorsální kořeny míšní předává po vzestupných drahách do mozku monosynaptickými či polysynaptickými drahami. Vzestupné dráhy zahrnují spinotalamické, spinoretikulotalamické dráhy, které převádí signál o bolesti do talamu. Další dráhy zahrnují prarabrachiální jádro spojené s amygdalou, která bolesti přiřazuje emoční náboj. Z talamu se informace šíří až do mozkové kůry, kde je zpráva o bolesti interpretována. Pro vnímání bolesti však mozek nemá jednu lokalizovanou strukturu, aktivuje se totiž více oblastí mozkové kůry současně ^{64,65}.

Opioidní receptory mohou modulovat vedení bolesti na několika úrovních. A to zejména v periferiích, v dorzálních kořenech míšních, v míše, v supraspinálních oblastech, a dokonce i v sestupných drahách modulujících inhibiční signály pro přerušení vedení bolesti. Všude tam jsou exprimovány opioidní receptory, které prostřednictvím mechanismu pre- a postsynaptické inhibice znemožňují vedení signálu po vzestupných drahách. Dalším důležitým mechanismem je pak inaktivace GABAerních inhibičních interneuronů (které normálně blokují inhibici bolesti přes sestupné dráhy) v sestupných drahách. Dochází tak k aktivaci inhibičních sestupných drah, které prostřednictvím noradrenergických, serotonergních a opioidních interneuronů potlačují přenos signálu bolesti ^{45,54,63}.

Neuroprotektivní účinky morfinu

Protektivní účinky morfinu na neurony při ischemii – morfinová prekondice

Přerušení zásobování krví je pro mozek často fatální záležitostí. Mozková tkáň je totiž kvůli svým velkým nárokům na energii velmi citlivá na hladinu kyslíku a glukózy. Není tak překvapením, že právě mozková ischemie je jednou z nejčastějších příčin vzniku závažných a často až smrtelných poškození mozku. Mezi další onemocnění, která významně poškozují nervovou tkáň, patří epileptické záchvaty, delirace či neurokognitivní dysfunkce ^{66,67}. Jelikož na mozkovou ischemii připadá ve Spojených státech amerických ročně více jak dvacet tisíc úmrtí ⁶⁸ a má nemalý dopad na lidské zdraví a z toho i plynoucí finanční ztráty, mnohé vědecké týmy zaměřily svou pozornost na výzkum metod, jak docílit zvýšení tolerance neuronů na ischemii a s ní související hypoxii.

Jedním z kandidátů pro tento úkol se zdá být právě morfin. Na *in vitro* morfinem stimulovanou neuroprotekcí poukazují ve své práci Y. Lim a kol. ⁶⁹. Tuto morfinem stimulovanou protekcí pozorovali u Purkyňových buněk, které při ischemii mění svoji morfologii v důsledku jejich apoptózy. U Purkyňových buněk vyvolali ischemii pomocí deprivace kyslíkem a glukózou (OGD), která podle všeho nejlépe napodobuje podmínky, které se odehrávají i *in vivo* při ischemii. Mozkové řezy před vyvolávanou ischemií inkubovali s morfinem, a to buď v nepřítomnosti či přítomnosti neselektivních a

selektivních antagonistů jednotlivých subtypů opioidních receptorů. Po třiceti minutách promývání následovala pak dvacetiminutová OGD. I přesto, že deprivace byla indukována velmi brzy po podání morfinu, pozorovali zvýšenou toleranci k ischemii u Purkyňových buněk. Tato neuroprotektce byla zablokována použitím neselektivních antagonistů nebo selektivních antagonistů pro δ_1 -typ opioidních receptorů. U ostatních použitých antagonistů μ -, κ - a δ_2 -subtypů opioidních receptorů žádnou blokaci neuroprotektivního účinku stimulovaného morfinem nezaznamenali. Z jejich závěrů tedy vyplývá, že za neuroprotektivní účinek morfinu jsou zodpovědné právě δ_1 -opioidní receptory⁶⁹.

Právě δ_1 -opioidní receptory jsou považovány za jedny z hlavních opioidních receptorů, které stojí i za kardioprotektivním účinkem vyvolaným morfinem chránící srdce před ischemií⁷⁰⁻⁷³. Tento kardioprotektivní účinek vyvolaný aktivací δ_1 -opioidních receptorů je dle výsledků studií navozen jednak přímo podáváním morfinu tzv. morfinovou prekondicí^{71,72}, tak i ischemickou prekondicí^{70,73,74}, která je definovaná jako „jev, při kterém krátké epizody subletální ischemie navozují mohutnou ochranu proti škodlivým účinkům následné smrtelné ischemie“⁷⁵. Endogenně aktivované δ_1 -opioidní receptory, by totiž mohly spouštět signální dráhu navozující ischemickou prekondici⁷⁴.

Po aktivaci δ_1 -opioidních receptorů na buněčné membráně se však nabízí otázka, jaké jsou vnitrobuněčné mediátory zodpovědné za neroprotektivitu indukovanou morfinem. Odpovědi na tuto otázku by mohli být podle Y. Lim a kol.⁶⁹ mitochondriální draselné (K^+)_{ATP} iontové kanály spolu s indukcí produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Po použití 5-hydroxydekanoátu (selektivní inhibitor mitochondriálních draselných (K^+)_{ATP} iontových kanálů) a myxothiazolu (inhibitor mitochondriálního transportního systému III, inhibující i vznik ROS v mitochondriích) pozorovali částečné zablokování neuroprotektivního efektu morfinu⁶⁹.

Opioidní prekondici se zabývá i práce P. Zhao a kol.⁷⁶, kteří pozorovali neuroprotektu stimulovanou morfinem na řezech hipokampu potkanů z oblasti CA1 *in vitro* a *in vivo* na modelu okluze arterie středního mozku (MCAO). Neuroprotektivní efekt stimulovaný morfinem byl pozorován opět za podmínek ischemie indukované pomocí OGD. Zajímavé je ovšem to, že tento neuroprotektivní efekt byl pozorován i po několika hodinách (i po 24 hodinách) po podání morfinu. Podle pozorovaných výsledků na neuronech z CA1 regionu hipokampu potkanů, by tato „posunutá“ prekondice mohla být zprostředkována nejen pomocí δ_1 -opioidních receptorů ale i prostřednictvím μ -opioidních receptorů. Tento předpoklad vyplývá z toho, že při inkubaci řezů hipokampu s morfinem byl „posunutý“ neuroprotektivní účinek anulován prostřednictvím β -FNA, selektivním antagonistou μ -opioidních receptorů, ale nebyl blokován 7-benzylidenenaltrexonem, selektivním inhibitorem δ_1 -opioidních receptorů. Nicméně „posunutý“ neuroprotektivní účinek, byl pozorován i po podání Tan-67 (selektivní agonista δ_1 -opioidních receptorů). Z uvedených dat tak vyplývá, že by δ_1 -opioidní receptory

mohli být zodpovědné za akutní neuroprotektivní účinek, kdežto μ -opioidní receptory by mohli indukovat „posunutý“ neuroprotektivní účinek vyvolaný morfinem ⁷⁶.

Tyto prvotní práce bohužel neposkytují mnoho informací o vnitrobuněčných mechanismech, které zprostředkovávají neuroprotektivní efekt indukovaný morfinem. S možným objasněním intracelulárních pochodů přišel M. Fanjun a kol. ⁷⁵ ve své práci na hipokampálních řezech, u kterých vyvolávali ischemii podobné účinky opět prostřednictvím OGD, jenž po delší době bez předešlého podání morfinu vyvolala v řezech zvýšenou apoptózu neuronů. I zde morfin prokázal svůj neuroprotektivní účinek. M. Fanjun a kol. se zde zaměřují na možnost, zda by mohly být do procesu neuroprotektce zapojeny N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a proteinkináza C (PKC), respektive její isoforma ϵ (nPKC ϵ). Současná inkubace řezů s morfinem a selektivními inhibitory těchto proteinů vedla k částečnému potlačení neuroprotektce. Samotné působení morfinu inhibovalo translokaci nPKC ϵ k membráně a fosforylaci NR1 podjednotky NMDA receptoru. Výsledky testování poukazují na možnost, že ovlivnění funkce NMDA receptorů nebo nPKC ϵ morfinem před ischemií, je spojeno s morfinem indukovanou neuroprotektcí. Kombinovaná inhibice NMDA receptorů a nPKC ϵ odhalila dokonce i jejich možnou provázanost v signální kaskádě morfinem indukované neuroprotektce ⁷⁵.

Podezření na zapojení do neuroprotektce padlo na NMDA receptory a nPKC ϵ hned z několika důvodů. Jak již bylo uvedeno, za zprostředkovatele neuroprotektce indukované morfinem se považují δ -opioidní receptory ⁷⁵. Tyto receptory jsou spráženy s G-proteiny, které po aktivaci uvolněným $G_{\beta\gamma}$ komplexem aktivují fosfolipázu C (PLC) ⁷⁷, která štěpením fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu dá vznik inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃) (který svým navázáním na IP₃-dependentní Ca^{2+} kanál zvýší influx Ca^{2+} iontů z endoplazmatického retikula do buňky) a 1,2-diacylglycerolu (DAG). DAG je právě nezbytný k aktivaci nPKC ϵ ⁷⁸.

Aktivovaná nPKC ϵ by pak mohla být zodpovědná za fosforylaci NR1 podjednotky NMDA receptorů (respektive na Ser⁸⁹⁰ podjednotky), tím regulovat aktivitu NMDA receptorů a tak může vyvolat zvýšený influx Ca^{2+} iontů ⁷⁹. Jelikož předčasným podáním inhibitoru PKC se může předejít tomuto zvýšení aktivity NMDA receptorů, prostřednictvím redukce fosforylace NR1 podjednotky NMDA receptorů ⁸⁰. Podle těchto výsledků by NMDA receptory pak mohly být cílem nPKC ϵ v průběhu podávání morfinu před OGD ⁷⁵.

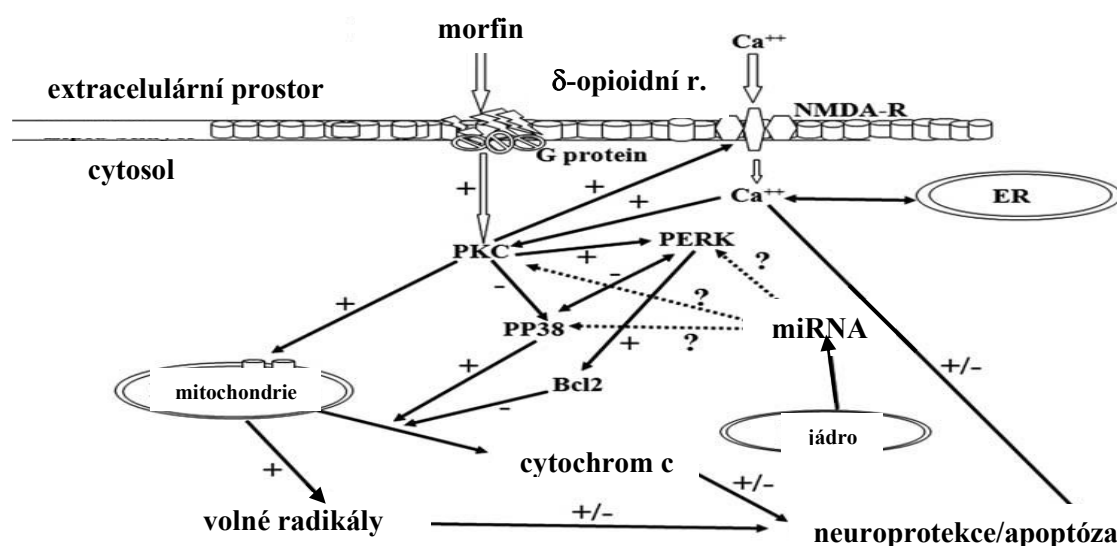
Jak se ukázalo morfin částečně působí na aktivaci PKC přes aktivaci PLC, ale jeho neuroprotektivní účinek souvisí s inhibicí translokace PKC, která se pak neaktivuje ⁷⁵. Aktivace PKC je asociována s její translokací k cytoplazmatické membráně ⁸¹, kdy bylo poukázáno na korelaci mezi velikostí translokace PKC k plazmatické membráně a rozsahem poranění buněk při ischemii ^{82,83}. Morfin jak se ukázalo

působí jako inhibitor translokace nPKCε v průběhu reperfuze tkání, kdy tento účinek morfinu je anulován podáním ϵ_{1-2} , selektivního antagonisty nPKCε ⁷⁵.

Shrnutím těchto poznatků by se dal neuroprotektivní účinek morfinu vysvětlit tak, že při prekonici morfinem se částečně aktivují nPKCε a NMDA receptory, což pak při OGD inhibuje následné velké zvýšení translokace nPKCε a fosforylace NMDA receptorů ⁷⁵.

PKC hraje v kaskádě neuroprotektivního účinku morfinu ústřední roli, jelikož svou aktivací ovlivňuje hned několik signálních drah ^{75,84-86} (obr. č. 3.). Aktivace signální dráhy δ -opioidní receptor/PKC morfinem zřejmě stojí za kontrolou i některých proapoptických faktorů, jako p38mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) a uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Regulace je zřejmě řízena prostřednictvím zvýšení signalizace z extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK) a zvýšené aktivity Bcl-2, které působí proti hypoxií indukované zvýšené aktivitě MAPK a následného vylití cytochromu c ⁸⁷. Vylití cytochromu c je jeden z hlavních signálů vedoucích k programované buněčné smrti.

Podle posledních studií by se na neuroprotektivním účinku morfinu mohli účastnit i některé mikroRNA (miRNA), jejichž exprese by mohla být regulována prostřednictvím δ -opioidních receptorů a inhibovat tak i zánětlivou odpověď na hypoxii/ischemii ⁸⁸. MiRNA jsou krátké molekuly RNA (21-25 ribonukleotidů dlouhé jednořetězcové nekódující molekuly RNA), které se vyskytují ve všech eukaryotických buňkách ⁸⁹. Do dnešních dnů bylo nalezeno přes 2000 lidských miRNA ⁹⁰. MiRNA se vážou na různorodé messengerové RNA (mRNA), prostřednictvím párování bazí na 3' nepřekládaných regionech mRNA (3'-UTR), čímž regulují sestřih a/nebo represi translace cílových mRNA ⁹¹.



Obrázek č. 3 Neuroprotektivní dráhy aktivované morfinem

miR-134 označuje miRNA-134; NMDA-R, NMDA receptor; PKC, protein kináza C; ER, endoplazmatické retikulum; PP38, fosforylovaný P38; PERK, fosforylovaná extracelulární signálně regulovaná kináza; Ca^{++} , iont vápníku; +, zvýšení; -, omezení.

(převzato a upraveno podle ⁶⁷)

MiRNA hrají důležitou roli v fyziologických či patologických procesech, jako je například hypoxie a ischemie⁸⁸ v mozku^{92,93} a v dalších na hypoxii/ischemii senzitivních orgánech⁹⁴, kdy se mění jejich exprese. MiRNA jsou schopné regulovat zánětlivé procesy, jako aktivace mikroglíí, produkce cytokinů či vývoj buněk imunitního systému, a také apoptózu v odpovědi na mozkovou hypoxii/ischemii⁸⁸. Podle posledních výzkumů mají na regulaci exprese některých miRNA vliv δ -opioidní receptory⁸⁸. Mezi takto regulované miRNA můžeme zařadit například miR-31, která je po aktivaci δ -opioidních receptorů up-regulována v průběhu hypoxie⁹². Tato up-regulace měla za následek inhibici prozánětlivých TH1 buněk a glukózového metabolismu^{95,96}. U stejného zvířecího modelu byla pozorována i down-regulace miR-347 a miR-466b po aktivaci δ -opioidních receptorů⁹².

Možné protektivní účinky morfinu na nervovou tkáň prostřednictvím aktivace δ -opioidních receptorů byly zaznamenány i proti poškození způsobných reperfuzí po ischemii. Po obnovení toku krve v mozku, a tedy i obnovení zásobování kyslíkem dochází při reperfuzi k produkci ROS a volných radikálů, což má za následek poškození nervové tkáně^{97,98}. δ -opioidní receptory, jak se zdá, mají vliv na regulaci proteinkinázy B (Akt) a fosfatidylinositol-3-kinázy (PI₃K)^{99,100}, jenž je aktivovaná právě pomocí Akt. Dráha Akt/PI₃K má totiž neuroprotektivní účinky při reperfuzi po ischemii¹⁰⁰.

Protektivní účinky morfinu u neuroglíí se zaměřením na astrocyty

Gliové buňky jsou pro správné fungování a přežívání neuronů nezbytné. Jedním z mnoha typů neuroglíí jsou astrocyty, které neuronům poskytují živiny, růstové faktory, cytokiny a uvolňují i některé neurotransmitery, což jim dovoluje komunikovat s neurony a ostatními gliovými buňkami¹⁰¹. Astrocyty ochraňují neurony i před toxickými účinky různých látek, ovšem při některých patologických podmínkách vyvolaných vnějšími vlivy, může docházet k nadměrnému uvolňování neurotransmiterů neurony a gliovými buňkami. Mezi takto uvolňované neurotransmitery se zařazuje i glutamát, excitační neurotransmitter, který může zprostředkovávat interakci mezi neurony a gliovými buňkami¹⁰². Avšak chronické zvýšení hladiny extracelulárního glutamátu má za následek zvýšenou apoptózu neuronů i gliových buněk, což může vést k rozvoji závažných onemocnění, jako jsou epilepsie a Parkinsonova choroba¹⁰³. V průběhu ischemie dochází také k masivnímu výlevu glutamátu a poškození nervové tkáně jeho toxickým působením¹⁰⁴.

Jeden z hlavních důvodů toxicity glutamátu je uváděna jeho excitotoxicita působící na neurony¹⁰⁵. Za excitotoxicitou glutamátu stojí jeho schopnost indukovat vstup Ca²⁺ iontů do buňky prostřednictvím aktivace glutamátových NMDA receptorů^{106,107}. NMDA receptory jsou hyperaktivovány nadměrným množstvím glutamátu, což vede k masivnímu influxu Ca²⁺ iontů do buňky. Dlouhodobě vysoká hladina Ca²⁺ iontů má pak za následek excitotoxicitu¹⁰⁸. Zvýšení koncentrace intracelulárních Ca²⁺ iontů aktivuje řadu fosfolipáz, endonukleáz a proteáz dependentních na Ca²⁺ iontech, což vede k destrukci

důležitých buněčných struktur jako jsou DNA, cytoskelet a buněčné membrány¹⁰⁴. Zničením buněčných membrán pak dochází k dalšímu vtoku Ca^{2+} iontů, uvolňování ROS a dalších proapoptotických faktorů ze zničených mitochondrií, což následně vede k buněčné smrti^{104,109}.

V raném stádiu zvýšené hladiny extracelulárního glutamátu se receptory na astrocytech aktivují přednostně před receptory neurálními, což v důsledku může mít vliv na snížení toxického účinku glutamátu na neurony^{110,111}. Uvolňování Ca^{2+} iontů indukované glutamátem bylo v kultuře astrocytů odebraných ze spinální míchy signifikantně sníženo podáním morfinu, což mělo za následek sníženou mortalitu buněk¹¹². Věřící se, že morfin aktivací opioidních receptorů v astrocytech inhiboval adenylátcyklázu, která pak nebyla schopná svou další aktivitou zvýšit intracelulární hladinu Ca^{2+} iontů¹¹³.

Glutamátem indukovaná excitotoxicita může indukovat i stres v endoplazmatickém retikulu^{114,115}, jenž vede k depleci vápenatých Ca^{2+} iontů z endoplazmatického retikula. Důsledkem toho se v endoplazmatické retikulu hromadí špatně sbalené proteiny. Následkem toho je aktivována buněčná odpověď na nesbalené proteiny (UPR), která aktivuje membránové proteiny endoplazmatického retikula IRE1, PERK a aktivační transkripční faktor 6 (ATF6), jenž můžou aktivovat transkripční faktor CHOP a ostatní proapoptické faktory^{116–118}. Při podání morfinu astrocytům, však došlo k inhibici zvýšeného vylití Ca^{2+} indukované glutamátem a tato signální kaskáda nemohla být aktivována, což vedlo k snížené expresi CHOP¹¹².

Do buněčné smrti vyvolané glutamátem je zapojena i apoptóza indukovaná vylitím cytochromu c z mitochondrií a aktivací Fas receptorů. Při dlouhodobě zvýšené hladině glutamátu byla totiž pozorována zvýšená exprese kaspázy-9, kaspázy-8 a kaspázy-3, jenž jsou zapojeny do apoptózy buňky výlevem cytochromu c z mitochondrií a aktivací Fas receptorů¹¹². Neaktivní prokaspázu-9 totiž štěpí právě enzymový komplex s cytochromem c, jenž ji tak aktivuje. Aktivace cytochromem c je součástí tzv. vnitřní dráhy aktivace apoptózy. Kaspáza-8 je však aktivována prostřednictvím Fas receptorů. Aktivace pomocí Fas receptorů je součástí tzv. vnější dráhy aktivace apoptózy. Aktivovaná iniciační kaspáza-8/-9 pak štěpí prokaspázu-3, která je tak aktivována, a jejím prostřednictvím je pak následně indukována kaskáda dějů apoptózy^{119,120}.

Při inkubaci astrocytů s morfinem, však byla apoptóza indukovaná glutamátem signifikantně snížena, jelikož morfin redukoval množství štěpených kaspáz-9 a -3, které tak nebyly schopné indukovat apoptózu. Množství aktivované kaspázy-8 bylo ovlivněno méně, což by mohlo být interpretováno tak, že morfin reguluje apoptózu vyvolanou vylitím cytochromu c z mitochondrií, ale neovlivňuje signální dráhu Fas receptoru (tzv. „death receptor“) v astrocytech¹¹².

Na cytotoxicitě glutamátu se podílí i deplece glutathionu (GSH). GSH je důležitý antioxidant, který je schopen zabránit destruktivním účinkům ROS na organismus, jenž jsou ve zvýšené míře uvolňovány při zvýšené hladině glutamátu ¹²¹. Murphy a kol. ¹²² tvrdí, že excitotoxicita glutamátu je výsledek inhibice cysteinového transportu, kdy právě cystein je prekursorem pro GSH ^{123,124} a nedostatek GSH pak vede ke zvýšené koncentraci ROS. Výsledky studie J. Lee a kol. ¹²¹ pak ukazují na možnost, že morfin inhibuje glutamátem indukovanou apoptózu astrocytů prostřednictvím tzv. „scavenging“ efektu (snížení produkce a inaktivace ROS), kdy protektivní role morfinu zde není zprostředkována opioidními receptory. Podáním morfinu se totiž předešlo depleci GSH a produkci ROS (respektive H₂O₂) ¹²¹.

Produkcí ROS nemají na svědomí pouze astrocyty. Mikroglie zvyšují produkci ROS, jako odpověď na aktivaci antigenem, např. lipopolysacharidem (LPS). Tato zvýšená produkce ROS má však za následek destrukci buněčných struktur neuronů i gliových buněk. Morfin v tomto případě inhibuje produkci ROS v mikroglíích indukovanou LPS inhibicí translokace p47^{phox}, která je regulována prostřednictvím signální dráhy MAPK. p47^{phox} je totiž nezbytná pro aktivitu NADPH oxidázy produkující ROS ¹²⁵.

Další neuroprotektivní účinky morfinu

Mezi další neuroprotektivní účinky morfinu by se dala zařadit možnost modulace metabolismu β -amyloidu (A β). Produkce oxidu dusného (NO) indukovaná morfinem by mohla mít vliv i na produkci A β , jehož nadměrná akumulace v mozku souvisí s Alzheimerovou chorobou ¹²⁶. Podle studie T. Paka a kol. ¹²⁷ je signální dráha morfin/NO zodpovědná za modifikaci produkce proteinů β -sekretáza-1 a β -sekretáza-2, jenž jsou kritické pro produkci A β . Dráha morfin/NO totiž vyvolává sníženou produkci β -sekretázy-1 (iniciační proteolytický enzym pro syntézu A β) a zvýšenou produkci β -sekretázy-2, která je zodpovědná za katabolismus A β , protože inhibuje syntézu A β pomocí sestřihu prekursoru amyloidního proteinu (APP) a A β se tak není schopen zformovat ¹²⁷.

Apoptické účinky morfinu

Neurotoxické účinky morfinu – proapoptické faktory

I přes veškeré dosud popsané neuroprotektivní účinky se vyskytují i případy, kdy morfin působí na buňky apopticky. Apoptické účinky morfinu byly popsány u různých buněčných typů, mezi které se počítají například splenocyty ¹²⁸, thymocyty ¹²⁹, hepatocyty ^{130,131} a dokonce i neurony a neuroglie ¹³². Neurotoxický účinek morfinu byl zaznamenán v případech jeho akutního podání ve vysokých dávkách ¹³³, ale i při jeho chronickém podávání, kdy indukoval apoptózu neurálních buněk v parietálních, frontálních, temporálních, okcipitálních, entorhinálních, pyriformních, a hipokampálních (C1, C2 a C3) oblastech mozku potkana a jeho míše ¹³².

V současné době neexistuje podrobný molekulární mechanismus, který by popisoval morfinem indukovanou apoptózu buněk, existují však studie, které alespoň z části osvětlují tento mechanismus, prostřednictvím klíčových proteinů, jenž jsou zahrnuty v regulaci programované buněčné smrti. Mezi tyto proteiny řadíme proteiny z rodiny Bcl, respektive Bcl-2 a Bcl-x_L, které jsou zodpovědné za potlačování indukce apoptózy, a proteiny Bax a Bak, které mají proapoptické účinky. Bcl-2 protein se vyskytuje na povrchu mitochondriální membrány, kde je životně důležitý pro ochranu buněk před aktivací apoptózy ¹³⁴, oproti Bax proteinu, jenž pomocí permeabilizace mitochondriální membrány uvolňuje cytochrom c z mitochondrií, který aktivací kaspázy-9 a následně kaspázy-3 aktivuje signální kaskádu vedoucí k programované buněčné smrti ¹³⁵.

Ve studii o apoptickém účinku morfinu na makrofágy to byl právě Bax protein, jehož syntéza byla v makrofázích indukována morfinem. Up-regulace Bax proteinu pak kaskádou dějů způsobila jejich apoptózu ¹³⁶. Akumulace Bax proteinu souvisela s akumulací dalšího proapoptického faktoru, jímž je protein p53, který byl morfinem také up-regulován.

Protein p53 je jaderný protein, který patří mezi transkripční faktory, jejichž funkcí je hlídat stav DNA. Při poškození DNA dojde k aktivaci signalizační kaskády, na jejímž konci je fosforylace přenašeče MDM2, na kterém je p53 za normálních podmínek navázán a inaktivní. Fosforylací přenašeče MDM2 dochází k uvolnění proteinu p53, čímž se spustí signalizační kaskáda, která zahrnuje up-regulaci Bax proteinu ^{137,138}, což následně vede k apoptóze buňky.

Akumulace p53 v makrofázích po podání morfinu byla dle výsledků navozena zvýšenou produkcí NO ¹³⁶. Morfin může vyvolat zvýšenou produkci NO prostřednictvím intracelulární regulace vápníku a aktivací Ca²⁺/calmodulin dependentní proteinkinázy (CAMK) ¹³⁹, či přímo prostřednictvím receptorů citlivých na naloxon ¹⁴⁰.

Shrnutím těchto poznatků můžeme dojít k závěru, že aplikací morfinu se zvýší produkce NO, což má za následek akumulaci a aktivaci proteinu p53 ¹⁴¹, který následně ovlivní syntézu Bax, čímž jeho koncentrace vzroste a následně tak aktivuje apoptózu.

Dalším klíčovým proteinem, podílejícím se na regulaci programované buněčné smrti je Fas receptor, jehož zvýšená syntéza je opět indukována morfinem ¹⁴². Fas receptor je transmembránový protein řadící se do rodiny receptorů pro tumor nekrotizující faktory (TNF). Fas receptor je využíván buňkami imunitního systému (hlavně cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami), které ho pomocí Fas-ligandu aktivují a tím spustí apoptózu dané buňky ¹⁴³. Podle studie D. Yin ¹⁴² je za zvýšenou apoptózu buněk (v tomto případě periferních krevních lymfocytů (PBL)) zodpovědný právě morfin, jenž zvýšil syntézu Fas receptorů, které po aktivaci Fas-ligandem indukovali apoptózu buňky. PBL spáchaly apoptózu po stimulaci L-buňkami, které syntetizují Fas-ligand. Tato apoptóza musela být specificky stimulována

pomocí Fas receptoru, jelikož buňky, kterým byl podán morfin, nespáchaly apoptózu, když byly stimulovány L-buňkami, které syntetizovaly Fas-ligand v antisense orientaci ¹⁴².

Zůstává ovšem otázkou, jaké receptory spouští intracelulární signální kaskádu, jenž indukuje syntézu proapoptických faktorů. Mezi možné kandidáty jsou zařazeny μ -opioidní receptory a NMDA receptory. Aktivita NMDA receptorů je modifikována pomocí enzymatické aktivity PKC ¹⁴⁴, respektive nPKC ϵ , jenž je aktivována v signální kaskádě μ -opioidních receptorů ^{144,145}. Ve studii J.Mao a kol. ¹⁴⁶ se poukazuje na zvýšenou aktivitu NMDA receptorů a regionálně zvýšenou dostupnost glutamátu po aplikaci morfinu ¹⁴⁶. Zvýšená vzrušivost NMDA receptorů (tzv. „NMDA priming“), spolu se zvýšenou regionální dostupností glutamátu umožňují zvýšenou aktivaci NMDA receptorů i přes silný akutní inhibiční účinek morfinu na synaptický přenos ¹⁴⁶, což pak při dlouhodobém podávání morfinu může vést k nárůstu syntézy proapoptických faktorů, jako Bax a kaspáza-3, a k poklesu antiapoptických faktorů, jako Bcl-2 ¹⁴⁶, což následně vede k apoptóze neurálních buněk.

Podle studie M.F. Fjelldala a kol. ¹⁴⁷ by ovlivnění NMDA receptorů morfinem, respektive jejich GluN2B podjednotky, mohlo mít negativní vliv na vývoj mozečku. Podle výsledků této studie vede prenatální expozice opioidům prostřednictvím aktivace opioidních receptorů ke snížení postnatální exprese GluN2B v mozečku potkanů, která hraje důležitou roli ve vývoji plasticity mozečku ¹⁴⁷.

Knock-out μ -opioidních receptorů – zvýšená neurogeneze

Morfin se podle nedávných výzkumů významně podílí na regulaci hipokampu, jeho biochemie, fyziologie i neurogeneze prostřednictvím μ -opioidních receptorů ^{148–150}. Existují záznamy, kdy při chronickém podávání morfinu byly pozorovány negativní vlivy na specifické hipokampální funkce, jako je prostorové učení, diskriminace vzorců a regulace nálad ^{151–153}. Tyto negativní vlivy by mohly být způsobeny právě regulací hipokampu, a to ovlivněním přežití nových neuronů. Nové neurony se tvoří z progenitorů v hipokampální struktuře *gyrus dentatus* ¹⁵⁴, kde dochází i k jejich neurogenezi. Neurogeneze těchto progenitorů však může být ovlivněna enviromentálními i fyziologickými stimuly, včetně morfinu ^{155,156}.

Teorie o negativních vlivech morfinu na progenitory neuronů, podporují i studie, zabývající se knock-outem μ -opioidních receptorů ¹⁵⁷. U myši u nichž byl gen pro μ -opioidní receptory umlčen, byla pozorována normální proliferace a diferenciace neuronů, ale zvýšená pravděpodobnost přežití nových neuronů a více granulárních buněk na rozdíl od wild-type myši ¹⁵⁷. μ -opioidní receptory jsou, jak se zdá, schopny regulovat množství faktorů důležitých pro přežití buněk v *gyrus dentatus*. Mezi tyto faktory můžeme zařadit i neurotransmitery, jejichž množství je pomocí μ -opioidních receptorů v hipokampu ovlivňováno. Neurotransmitery, které jsou takto ovlivňovány jsou například acetylcholin (ACh) ¹⁵⁸, GABA ¹⁵⁹ či noradrenalin (NE) ¹⁶⁰. Regulace množství zvláště ACh totiž může ovlivňovat přežití

progenitorů^{161,162}. Což podporuje i studie zabývající se dlouhodobým blokováním acetylcholinesterázy (AChE). Tato studie ukazuje na zvýšené přežívání buněk progenitorů bez ovlivnění jejich proliferace¹⁶³. Dalším kandidátem pro vysvětlení ovlivnění neurogeneze v hipokampu by mohl být NE. Při použití antagonisty $\alpha 2$ -adrenoceptoru, jenž zvyšuje hladinu NE, dochází ke zvýšené neurogenезi prostřednictvím zvýšení počtu přeživších nových neuronů v hipokampu nezávisle na změnách proliferace¹⁶⁴. Morfin však negativně reguluje uvolňování NE¹⁶⁰ a ACh¹⁶⁵ v potkaním hipokampu.

Morfinem ovlivněný vývoj progenitorů neuronů by se dal podle studie Y. Zhang¹⁶⁶ a kolektivu vysvětlit i pomocí regulace NeuroD1 morfinem¹⁶⁶. NeuroD1 je transkripční faktor, který podporuje diferenciaci nervových prekursorových buněk¹⁶⁶ a je nezbytný i pro to, aby se neurální progenitory v pozdním stádiu diferenciace vyvinuly v granulární hipokampální neurony^{167,168}. Proto může morfin, regulací aktivit NeuroD1 modulovat diferenciaci progenitorů granulárních neuronů na zralé neurony¹⁶⁶. Exprese NeuroD1 by mohla být regulována prostřednictvím různých miRNA modulovaných morfinem, např. miR-190, u které byl pozorován její vliv na snížení exprese NeuroD1^{169,170}. Další vliv na snížení vlivu NeuroD1 na vývoj progenitorů by mohl souviset i se sníženou aktivitou Ca^{2+} /calmodulin-dependentní proteinkinázy II α (CAMKII α), která fosforyluje a aktivuje NeuroD1. Aktivita CAMKII α je morfinem také snižována¹⁶⁹.

Morfin a regulace vývoje nádoru

Apoptické účinky morfinu však nemusí na organismus působit vždy jen v negativním smyslu. Již po mnoho let se vede debata o efektu morfinu na regulaci růstu nádorů a jeho možném apoptickém účinku na jeho buňky, výzkumy však v tomto ohledu však přicházejí s protikladnými výsledky.

Podle výzkumu Tegeder a kol.¹⁷¹ má morfin inhibiční účinek na proliferaci buněk tumorů MCF-7 a MDA-MB-231 při koncentraci vyšší jak 10 μ M. S podobnými výsledky přichází i Yeager a Colacchio¹⁷², jenž na *in vivo* modelu metastázující rakoviny tlustého střeva u potkana pozorovali inhibici růstu tumoru po podání morfinu. I přes mnoho důkazů, že vysoké dávky morfinu redukuje růst nádorů, není mechanismus účinku docela znám. Objevují se ovšem teorie o možném zapojení κ - a δ -opioidních receptorů na inhibici proliferace rakoviny prsu¹⁷³. Naopak aktivace μ -opioidních receptorů v karcinomu plic podporuje jeho růst a tvorbu metastáz¹⁷⁴.

Pozorované inhibiční účinky morfinu na vývoj nádorů by mohly souviset s programovanou buněčnou smrtí buněk nádoru. S tímto názorem souvisí experiment, který aplikací vysokých dávek morfinu na linie lidských nádorových buněk, zkoumal počet buněk, jež spáchaly apoptózu prostřednictvím aktivace proapoptických kaspáz. Tyto kaspázy byly aktivovány uvolněním cytochromu c z mitochondrií^{175,176}. U různých linií lidských nádorových buněk se počty mrtvých buněk lišily, například u linie buněk MCF-7

rakoviny prsu byl zaznamenán větší počet mrtvých buněk než u linie buněk A549 rakoviny plic¹⁷⁷. Tyto rozdíly ukazují, že morfinem vyvolaná apoptóza buněk nádoru závisí na jejich typu.

Závěr

Morfin se řadí mezi látky, které lékařská věda používá již velmi dlouhou dobu. Velkého využití se morfinu dostává díky jeho antinociceptivním účinkům. Mechanismus jeho působení je zkoumán po celá staletí. Morfin však vyvolává u organismů i negativní vedlejší efekty a vznik závislosti, což snižuje možnosti jeho využití. O jeho neuroprotektivních a apoptických účincích se toho však do dnešní doby stále mnoho neví. Studie, které začaly podrobněji zkoumat mechanismus těchto účinků vznikly teprve před 30 lety. V těchto studiích se objevují důkazy o protektivním efektu morfinu na neurony. Ukazuje se, že morfin hraje důležitou úlohu při navozování zvýšené ischemické tolerance při neuronální deprivaci kyslíkem a glukózou. Dále je pak morfin zodpovědný i za potlačování excitotoxických účinků glutamátu na neurony, který je při patologických poruchách nadměrně uvolňován neurony a astrocyty. Za zprostředkovatele protektivních účinků morfinu se považují δ_1 -opioidní receptory. Tyto receptory spřažené s G-proteiny po své aktivaci morfinem stimulují různé signální kaskády ovlivňující PKC, Akt, PI_3K , NMDA receptory, iontové kanály a různé miRNA, jež svou aktivitou ovlivňují životní osud neuronů. Morfin modulací těchto kaskád reguluje syntézu a aktivitu proapoptických faktorů jako kaspáza-9 a kaspáza-3, které jsou zodpovědné za vylévání cytochromu c z mitochondrií a následnou aktivaci programované buněčné smrti. Objevují se však i studie ukazující na apoptické účinky morfinu. Morfin, jak se zdá, zvyšuje syntézu některých proapoptických faktorů, jako například Bak, Bax a p53, a snižuje produkci antiapoptických faktorů, jako například Bcl-2 a Bcl-x_L. Podle nejnovějších výzkumů morfin negativně ovlivňuje i neurogenezi v hipokampálních strukturách mozku. Avšak apoptické účinky morfinu nemusí být vždy jen negativní. Stále více studií zkoumá i apoptické účinky morfinu ve vztahu k regulaci vývoje tumorů. Vzhledem k často protichůdným výsledkům v řadě studií zkoumajících neuroprotektivní či apoptický efekt morfinu, by pokračující výzkum v tomto odvětví mohl přinést nové poznatky, které by mohly osvětlit mechanismus účinků morfinu a pomoci tak při jeho aplikaci v léčbě neurodegenerativních chorob.

Použitá literatura

1. Bentley, K. W. Sir Robert Robinson—his contribution to alkaloid chemistry. *Nat. Prod. Rep.* **4**, 13–23 (1987).
2. Gulland, J. M. & Robinson, R. CXII.—The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem. *J. Chem. Soc. Trans.* **123**, 980–998 (1923).
3. Hodgson, B. *In the arms of morpheus: The tragic history of laudanum, morphine, and patent medicines*. (Firefly Books Limited, 2001).
4. Remington, J. P. *Remington: The science and practice of pharmacy*. vol. 1 (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
5. Wink, M. & Van Wyk, B.-E. *Mind-altering and poisonous plants of the world*. (Timber Press, 2008).
6. Sumner, J. *The natural history of medicinal plants*. (Timber press, 2000).
7. Blakemore, P. R. & White, J. D. Morphine, the Proteus of organic molecules. *Chem. Commun.* 1159–1168 (2002).
8. Davenport-Hines, R. *The pursuit of oblivion: A global history of narcotics*. (WW Norton & Company, 2003).
9. Trease, G. E. *Pharmacy in history*. vol. 784 (Baillière, Tindall and Cox, 1964).
10. *Michael J. Brownstein. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5391–5393 (1993).
11. *Serturmer, F. W. Darstellung der reinen Mohnsaure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die darin gehörigen Bemerkungen. *Trommsdorffs J. der Pharm.* **14**, 47–98 (1805).
12. Ebadi, M. *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*. (CRC press, 2006).
13. Max, M. World Health Organization cancer pain relief program: network news. *J. Pain Symptom Manage.* **1**, 53–57 (1986).
14. Ruiz-Garcia, V. & Lopez-Briz, E. Morphine remains gold standard in breakthrough cancer pain. *Bmj* **337**, a3104 (2008).
15. Stein, C., Schäfer, M. & Machelska, H. Why is morphine not the ultimate analgesic and what can be done to improve it? *J. Pain* **1**, 51–56 (2000).

16. Ventafridda, V., Ripamonti, C., Bianchi, M., Sbanotto, A. & De Conno, F. A randomized study on oral administration of morphine and methadone in the treatment of cancer pain. *J. Pain Symptom Manage.* **1**, 203–207 (1986).
17. Hanks, G. W. Antiemetics for terminal cancer patients. *Lancet (London, England)* **1**, 1410 (1982).
18. Ventafridda, V. *et al.* A retrospective study on the use of oral morphine in cancer pain. *J. Pain Symptom Manage.* **2**, 77–81 (1987).
19. Twycross, R. G. & Lack, S. A. *Control of alimentary symptoms in far advanced cancer.* (Churchill Livingstone, 1986).
20. Sjøgren, P., Banning, A. M., Christensen, C. B. & Pedersen, O. Continuous reaction time after single dose, long-term oral and epidural opioid administration. *Eur. J. Anaesthesiol.* **11**, 95–100 (1994).
21. Bruera, E., Macmillan, K., Hanson, J. & MacDonald, R. N. The cognitive effects of the administration of narcotic analgesics in patients with cancer pain. *Pain* **39**, 13–16 (1989).
22. Vainio, A., Rosenberg, P., Kalso, E., Ollila, J. & Matikainen, E. Driving ability in cancer patients receiving long-term morphine analgesia. *Lancet* **346**, 667–670 (1995).
23. Sjøgren, P. & Banning, A. Pain, sedation and reaction time during long-term treatment of cancer patients with oral and epidural opioids. *Pain* **39**, 5–11 (1989).
24. Sjøgren, P., Banning, A., Larsen, T. K., Sørensen, C. G. & Jansen, E. C. Postural stability during long-term treatment of cancer patients with epidural opioids. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **34**, 410–412 (1990).
25. Sjøgren, P. & Eriksen, J. Opioid toxicity. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **7**, 465 (1994).
26. Ripamonti, C. & Bruera, E. CNS adverse effects of opioids in cancer patients. *CNS Drugs* **8**, 21–37 (1997).
27. Bruera, E., Brenneis, C., Paterson, A. H. & MacDonald, R. N. Use of methylphenidate as an adjuvant to narcotic analgesics in patients with advanced cancer. *J. Pain Symptom Manage.* **4**, 3–6 (1989).
28. Paix, A. *et al.* Subcutaneous fentanyl and sufentanil infusion substitution for morphine intolerance in cancer pain management. *PAIN®* **63**, 263–269 (1995).

29. Caraceni, A., Martini, C., De Conno, F. & Ventafridda, V. Organic brain syndromes and opioid administration for cancer pain. *J. Pain Symptom Manage.* **9**, 527–533 (1994).
30. Rane, A., Säwe, J., Dahlström, B., Paalzow, L. & Kager, L. Pharmacological treatment of cancer pain with special reference to the oral use of morphine. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **26**, 97–103 (1982).
31. Bodnar, R. J. & Klein, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides* **27**, 3391–3478 (2006).
32. Tsou, K. & Jang, C. S. Studies on the site of analgesic action of morphine by intracerebral micro-injection. *Sci. Sin.* **13**, 1099 (1964).
33. Stein, C. & Machelska, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. *Pharmacol. Rev.* **63**, 860–881 (2011).
34. Zöllner, C. & Stein, C. Opioids. in *analgesia* 31–63 (Springer, 2006).
35. Pert, C. B. & Snyder, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* (80-.). **179**, 1011–1014 (1973).
36. Terenius, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **32**, 317–320 (1973).
37. Wittert, G., Hope, P. & Pyle, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 877–881 (1996).
38. Villemagne, P. S., Dannals, R. F., Ravert, H. T. & Frost, J. J. PET imaging of human cardiac opioid receptors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **29**, 1385–1388 (2002).
39. Barry, U. & Zuo, Z. Opioids: old drugs for potential new applications. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 1343–1350 (2005).
40. Satoh, M., Seki, T. & Minami, M. Opioid receptors. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **45**, 985–990 (2000).
41. Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, (2013).
42. Waldhoer, M., Bartlett, S. E. & Whistler, J. L. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 953–990 (2004).

43. Martin, W., Eades, C. G., Thompson, Ja., Huppler, R. E. & Gilbert, P. E. The effects of morphine-and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **197**, 517–532 (1976).
44. Lord, J. A. H., Waterfield, A. A., Hughes, J. & Kosterlitz, H. W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **267**, 495–499 (1977).
45. Stein, C. Opioid Receptors. - PubMed - NCBI. *Annu. Rev. Med.* **67**, 433–451 (2016).
46. Quock, R. M. *et al.* The δ -opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol. Rev.* **51**, 503–532 (1999).
47. Pogozheva, I. D., Lomize, A. L. & Mosberg, H. I. Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys. J.* **75**, 612–634 (1998).
48. Minami, M. & Satoh, M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* **23**, 121–145 (1995).
49. Law, P.-Y. & Loh, H. H. Regulation of opioid receptor activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 607–624 (1999).
50. Chavkin, C., McLaughlin, J. P. & Cerver, J. P. Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization. *Mol. Pharmacol.* **60**, 20–25 (2001).
51. von Zastrow, M., Svingos, A., Haberstock-Debic, H. & Evans, C. Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 348–353 (2003).
52. Tedford, H. W. & Zamponi, G. W. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **58**, 837–862 (2006).
53. Lüscher, C. & Slesinger, P. A. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 301–315 (2010).
54. Vanderah, T. W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin. J. Pain* **26**, 10–15 (2010).
55. Wang, H.-B. *et al.* Coexpression of δ - and μ -opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13117–13122 (2010).
56. Nockemann, D. *et al.* The K⁺ channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral

- opioid-mediated analgesia. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1263–1277 (2013).
57. Gold, M. S. & Levine, J. D. DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* **212**, 83–86 (1996).
 58. Ingram, S. L. & Williams, J. T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron* **13**, 179–186 (1994).
 59. Cai, Q. *et al.* Morphine inhibits acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* **1554**, 12–20 (2014).
 60. Spahn, V. *et al.* Opioid withdrawal increases transient receptor potential vanilloid 1 activity in a protein kinase A-dependent manner. *Pain* **154**, 598–608 (2013).
 61. Endres-Becker, J. *et al.* μ -Opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol. Pharmacol.* **71**, 12–18 (2007).
 62. Williams, J. T. *et al.* Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol. Rev.* **65**, 223–254 (2013).
 63. Basbaum, A. I. The perception of pain, Principles of Neural Science, Edited by Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2000).
 64. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **139**, 267–284 (2009).
 65. Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R.-D. & Zubieta, J.-K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. pain* **9**, 463–484 (2005).
 66. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **79**, 1431–1568 (1999).
 67. Meng, F., Li, Y., Chi, W. & Li, J. Morphine preconditioning downregulates MicroRNA-134 expression against oxygen-glucose deprivation injuries in cultured neurons of mice. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **28**, 195–202 (2016).
 68. Martin, J. A., Smith, B. L., Mathews, T. J. & Ventura, S. J. Births and deaths: preliminary data for 1998. (1999).
 69. Lim, Y. J., Zheng, S. & Zuo, Z. Morphine Preconditions Purkinje Cells against Cell Death under in Vitro Simulated Ischemia-Reperfusion Conditions. *Anesthesiology* **100**, 562–568 (2004).
 70. Huh, J., Gross, G. J., Nagase, H. & Liang, B. T. Protection of cardiac myocytes via δ 1-opioid

- receptors, protein kinase C, and mitochondrial KATP channels. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **280**, H377–H383 (2001).
71. McPherson, B. C. & Yao, Z. Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* **94**, 1082–1088 (2001).
 72. McPherson, B. C. & Yao, Z. Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial KATP channels in myocytes. *Circulation* **103**, 290–295 (2001).
 73. Liang, B. T. & Gross, G. J. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ. Res.* **84**, 1396–1400 (1999).
 74. Schultz, J. E. J., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by δ 1-but not μ -or κ -opioid receptors. *Circulation* **97**, 1282–1289 (1998).
 75. *Fanjun, M., Junfa, L., Bingxi, Z. & Fang, J. nPKC ϵ and NMDA receptors participate in neuroprotection induced by morphine pretreatment. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **18**, 119–124 (2006).
 76. Zhao, P., Huang, Y. & Zuo, Z. Opioid preconditioning induces opioid receptor-dependent delayed neuroprotection against ischemia in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 945–952 (2006).
 77. Park, D., Jhon, D.-Y., Lee, C. W., Lee, K.-H. & Rhee, S. G. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 4573–4576 (1993).
 78. *Akita, Y. Protein kinase C- ϵ (PKC- ϵ): Its unique structure and function. *J. Biochem.* **132**, 847–852 (2002).
 79. Cheung, H. H., Teves, L., Wallace, M. C. & Gurd, J. W. Increased phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor following cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **78**, 1179–1182 (2001).
 80. Bickler, P. E., Fahlman, C. S. & Ferriero, D. M. Hypoxia increases calcium flux through cortical neuron glutamate receptors via protein kinase C. *J. Neurochem.* **88**, 878–884 (2004).
 81. Kraft, A. S. & Anderson, W. B. Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* **301**, 621–623 (1983).
 82. Katsura, K.-I., Kurihara, J., Kato, H. & Katayama, Y. Ischemic pre-conditioning affects the subcellular distribution of protein kinase C and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the gerbil hippocampal CA1 neurons. *Neurol. Res.* **23**, 751–754 (2001).

83. Huang, H., Weng, C., Ou, S. & Hwang, T. Selective subcellular redistributions of protein kinase C isoforms by chemical hypoxia. *J. Neurosci. Res.* **56**, 668–678 (1999).
84. Liu, C. *et al.* Identification of differentially expressed microRNAs and their PKC-isoform specific gene network prediction during hypoxic pre-conditioning and focal cerebral ischemia of mice. *J. Neurochem.* **120**, 830–841 (2012).
85. Chao, D. *et al.* DOR activation inhibits anoxic/ischemic Na⁺ influx through Na⁺ channels via PKC mechanisms in the cortex. *Exp. Neurol.* **236**, 228–239 (2012).
86. Liu, Y. *et al.* Inhibition of PKC γ membrane translocation mediated morphine preconditioning-induced neuroprotection against oxygen–glucose deprivation in the hippocampus slices of mice. *Neurosci. Lett.* **444**, 87–91 (2008).
87. Ma, M.-C., Qian, H., Ghassemi, F., Zhao, P. & Xia, Y. Oxygen-sensitive δ -opioid receptor-regulated survival and death signals novel insights into neuronal preconditioning and protection. *J. Biol. Chem.* **280**, 16208–16218 (2005).
88. Chen, Y. M., He, X. Z., Wang, S. M. & Xia, Y. δ -Opioid Receptors, microRNAs, and Neuroinflammation in Cerebral Ischemia/Hypoxia. *Front. Immunol.* **11**, 1–11 (2020).
89. Guo, L., Zhao, Y., Yang, S., Zhang, H. & Chen, F. An integrated analysis of miRNA, lncRNA, and mRNA expression profiles. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
90. Friedländer, M. R. *et al.* Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.* **15**, 1–17 (2014).
91. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
92. Yang, Y. *et al.* δ -opioid receptor activation and microRNA expression of the rat cortex in hypoxia. *PLoS One* **7**, e51524 (2012).
93. Yang, Y. *et al.* Effects of hypoxia and ischemia on microRNAs in the brain. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1292–1301 (2015).
94. Nallamshetty, S., Chan, S. Y. & Loscalzo, J. Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radic. Biol. Med.* **64**, 20–30 (2013).
95. Bardua, M. *et al.* MicroRNA-31 reduces the motility of proinflammatory T helper 1 lymphocytes. *Front. Immunol.* **9**, 2813 (2018).

96. Johansson, A. *et al.* miR-31 regulates energy metabolism and is suppressed in T cells from patients with Sjögren's syndrome. *Eur. J. Immunol.* **49**, 313–322 (2019).
97. Granger, D. N. & Kvietys, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol.* **6**, 524–551 (2015).
98. Xing, B. *et al.* Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke* **39**, 2362–2369 (2008).
99. Olianias, M. C., Dedoni, S. & Onali, P. Regulation of PI3K/Akt signaling by N-desmethyldiclozapine through activation of δ -opioid receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **660**, 341–350 (2011).
100. Lv, M. R. *et al.* Activation of the PI3K-Akt pathway promotes neuroprotection of the δ -opioid receptor agonist against cerebral ischemia-reperfusion injury in rat models. *Biomed. Pharmacother.* **93**, 230–237 (2017).
101. Glowinski, J. *et al.* Glial receptors and their intervention in astrocyto–astrocytic and astrocyto–neuronal interactions. *Glia* **11**, 201–208 (1994).
102. Danbolt, N. C., Furness, D. N. & Zhou, Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* **98**, 29–45 (2016).
103. Coyle, J. T. & Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (80-.).* **262**, 689–695 (1993).
104. Belov Kirdajova, D., Kriska, J., Tureckova, J. & Anderova, M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–27 (2020).
105. Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox. Res.* **8**, 221–225 (2005).
106. Gupta, K., Hardingham, G. E. & Chandran, S. NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons. *Neurosci. Lett.* **543**, 95–100 (2013).
107. Girling, K. D. *et al.* Activation of caspase-6 and cleavage of caspase-6 substrates is an early event in NMDA receptor–mediated excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* **96**, 391–406 (2018).
108. Warren, D. E. *et al.* Hypothermia and rewarming injury in hippocampal neurons involve intracellular Ca²⁺ and glutamate excitotoxicity. *Neuroscience* **207**, 316–325 (2012).

109. Kumagai, A. *et al.* Monitoring of glutamate-induced excitotoxicity by mitochondrial oxygen consumption. *Synapse* **73**, e22067 (2019).
110. Koriauli, S., Natsvlishvili, N., Barbakadze, T. & Mikeladze, D. Knockdown of interleukin-10 induces the redistribution of sigma1-receptor and increases the glutamate-dependent NADPH-oxidase activity in mouse brain neurons. *Biol. Res.* **48**, 1–5 (2015).
111. Lu, X. *et al.* Astrocyte-conditioned medium attenuates glutamate-induced apoptotic cell death in primary cultured spinal cord neurons of rats. *Neurol. Res.* **37**, 803–808 (2015).
112. Zhang, C., Wang, C., Ren, J., Guo, X. & Yun, K. Morphine protects spinal cord astrocytes from glutamate-induced apoptosis via reducing endoplasmic reticulum stress. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
113. Eriksson, P. S., Hansson, E. & Rönnbäck, L. δ and κ opiate receptors in primary astroglial cultures part II: Receptor sets in cultures from various brain regions and interactions with β -receptor activated cyclic AMP. *Neurochem. Res.* **17**, 545–551 (1992).
114. Suwanjang, W., Holmström, K. M., Chetsawang, B. & Abramov, A. Y. Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium* **53**, 256–263 (2013).
115. Chao, C. *et al.* Ca^{2+} store depletion and endoplasmic reticulum stress are involved in P2X7 receptor-mediated neurotoxicity in differentiated NG108-15 cells. *J. Cell. Biochem.* **113**, 1377–1385 (2012).
116. Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J. & Chen, Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **46**, 629–640 (2014).
117. Cunha, D. A. *et al.* Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic β -cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes* **58**, 2851–2862 (2009).
118. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
119. Benjelloun, N., Joly, L., Palmier, B., Plotkine, M. & Charriaut-Marlangue, C. Apoptotic mitochondrial pathway in neurones and astrocytes after neonatal hypoxia-ischaemia in the rat brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **29**, 350–360 (2003).
120. Kim, H.-E., Jiang, X., Du, F. & Wang, X. PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation

- by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1. *Mol. Cell* **30**, 239–247 (2008).
121. Lee, J. *et al.* Morphine Prevents Glutamate-Induced Death of Primary Rat Neonatal Astrocytes Through Modulation of Intracellular Redox. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **26**, 17–28 (2004).
 122. Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L. & Coyle, J. T. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* **2**, 1547–1558 (1989).
 123. Thor, H., Moldéus, P. & Orrenius, S. Metabolic activation and hepatotoxicity: effect of cysteine, N-acetylcysteine, and methionine on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 405–413 (1979).
 124. Meyer, M., Schreck, R. & Baeuerle, P. A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**, 2005–2015 (1993).
 125. Qian, L. *et al.* Microglia-Mediated Neurotoxicity Is Inhibited by Morphine through an Opioid Receptor-Independent Reduction of NADPH Oxidase Activity. *J. Immunol.* **179**, 1198–1209 (2007).
 126. Stefano, G. B., Zhu, W., Cadet, P., Bilfinger, T. V & Mantione, K. MORPHINE ENHANCES NITRIC OXIDE RELEASE IN THE. *J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 279–288 (2004).
 127. Pak, T., Cadet, P., Mantione, K. J. & Stefano, G. B. Morphine via nitric oxide modulates β -amyloid metabolism: A novel protective mechanism for Alzheimer's disease. *Med. Sci. Monit.* **11**, 357–366 (2005).
 128. Singhal, P. C., Reddy, K., Franki, N., Sanwal, V. & Gibbons, N. Morphine induces splenocyte apoptosis and enhanced mRNA expression of cathepsin-B. *Inflammation* **21**, 609–617 (1997).
 129. Sei, Y., Yoshimoto, K., McIntyre, T., Skolnick, P. & Arora, P. K. Morphine-induced thymic hypoplasia is glucocorticoid-dependent. *J. Immunol.* **146**, 194–198 (1991).
 130. Razaq, M., Balicas, M. & Mankan, N. Use of hydromorphone (Dilaudid) and morphine for patients with hepatic and renal impairment. *Am. J. Ther.* **14**, 414–416 (2007).
 131. Jaume, M. *et al.* Opioid receptor blockade reduces Fas-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **40**, 1136–1143 (2004).

132. Atici, S. *et al.* Opioid neurotoxicity: Comparison of morphine and tramadol in an experimental model. *Int. J. Neurosci.* **114**, 1001–1011 (2004).
133. Hodgson, P. S., Neal, J. M., Pollock, J. E. & Liu, S. S. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (Spinal). *Anesth. Analg.* **88**, 797–809 (1999).
134. Yuan, J. & Yankner, B. A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802–809 (2000).
135. McArthur, K. *et al.* BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science (80-.).* **359**, (2018).
136. Singhal, P. C. *et al.* Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.* **160**, 1886–1893 (1998).
137. Toshiyuki, M. & Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
138. Miyashita, T. *et al.* Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799–1805 (1994).
139. Stefano, G. B., Liu, Y. & Goligorsky, M. S. Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 19238–19242 (1996).
140. Joshi, J. C., Ray, A. & Gulati, K. Effects of morphine on stress induced anxiety in rats: role of nitric oxide and Hsp70. *Physiol. Behav.* **139**, 393–396 (2015).
141. Brüne, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* **10**, 864–869 (2003).
142. Yin, D., Mufson, R. A., Wang, R. & Shi, Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* **397**, 218 (1999).
143. Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (80-.).* **296**, 1635–1636 (2002).
144. Chen, L. & Marine, L.-Y. M. H. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a μ opioid. *Neuron* **7**, 319–326 (1991).
145. Zeitz, K. P., Malmberg, A. B., Gilbert, H. & Basbaum, A. I. Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC γ mutant mice. *Pain* **94**, 245–253 (2001).
146. Mao, J., Sung, B., Ji, R. R. & Lim, G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance:

- Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J. Neurosci.* **22**, 7650–7661 (2002).
147. Fjellidal, M. F. *et al.* Opioid receptor-mediated changes in the NMDA receptor in developing rat and chicken. *Int. J. Dev. Neurosci.* **78**, 19–27 (2019).
 148. Terman, G. W., Drake, C. T., Simmons, M. L., Milner, T. A. & Chavkin, C. Opioid modulation of recurrent excitation in the hippocampal dentate gyrus. *J. Neurosci.* **20**, 4379–4388 (2000).
 149. Martinez Jr, J. L. & Derrick, B. E. Long-term potentiation and learning. *Annu. Rev. Psychol.* **47**, 173–203 (1996).
 150. Morris, B. J. & Johnston, H. M. A role for hippocampal opioids in long-term functional plasticity. *Trends Neurosci.* **18**, 350–355 (1995).
 151. Spain, J. W. & Newsom, G. C. Chronic opioids impair acquisition of both radial maze and Y-maze choice escape. *Psychopharmacology (Berl)*. **105**, 101–106 (1991).
 152. Deng, W., Aimone, J. B. & Gage, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 339–350 (2010).
 153. Aimone, J. B. *et al.* Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* **94**, 991–1026 (2014).
 154. Abrous, D. N., Koehl, M. & Le Moal, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.* **85**, 523–569 (2005).
 155. Eisch, A. J. & Harburg, G. C. Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* **16**, 271–286 (2006).
 156. Eisch, A. J., Barrot, M., Schad, C. A., Self, D. W. & Nestler, E. J. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 7579–7584 (2000).
 157. Harburg, G. C. *et al.* Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience* **144**, 77–87 (2007).
 158. Kaplan, T. J., Skyers, P. R., Tabori, N. E., Drake, C. T. & Milner, T. A. Ultrastructural evidence for mu-opioid modulation of cholinergic pathways in rat dentate gyrus. *Brain Res.* **1019**, 28–38 (2004).
 159. Akaishi, T., Saito, H., Ito, Y., Ishige, K. & Ikegaya, Y. Morphine augments excitatory synaptic transmission in the dentate gyrus through GABAergic disinhibition. *Neurosci. Res.* **38**, 357–363

- (2000).
160. Matsumoto, M. *et al.* mu-Opioid receptors modulate noradrenaline release from the rat hippocampus as measured by brain microdialysis. *Brain Res.* **636**, 1–8 (1994).
 161. Mohapel, P., Leanza, G., Kokaia, M. & Lindvall, O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiol. Aging* **26**, 939–946 (2005).
 162. Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J. & Kuhn, H. G. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J. Neurosci. Res.* **77**, 155–165 (2004).
 163. Kotani, S., Yamauchi, T., Teramoto, T. & Ogura, H. Pharmacological evidence of cholinergic involvement in adult hippocampal neurogenesis in rats. *Neuroscience* **142**, 505–514 (2006).
 164. Rizk, P. *et al.* The alpha 2-adrenoceptor antagonist dexefaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. *Neuropsychopharmacology* **31**, 1146–1157 (2006).
 165. Lapchak, P. A., Araujo, D. M. & Collier, B. Regulation of endogenous acetylcholine release from mammalian brain slices by opiate receptors: hippocampus, striatum and cerebral cortex of guinea-pig and rat. *Neuroscience* **31**, 313–325 (1989).
 166. Zhang, Y., Xu, C., Zheng, H., Loh, H. H. & Law, P.-Y. Morphine modulates adult neurogenesis and contextual memory by impeding the maturation of neural progenitors. *PLoS One* **11**, e0153628 (2016).
 167. Roybon, L. *et al.* Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* **4**, e4779 (2009).
 168. Gao, Z. *et al.* Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* **12**, 1090–1092 (2009).
 169. Zheng, H. *et al.* Modulations of NeuroD activity contribute to the differential effects of morphine and fentanyl on dendritic spine stability. *J. Neurosci.* **30**, 8102–8110 (2010).
 170. Zheng, H., Zhang, Y., Li, W., Loh, H. H. & Law, P.-Y. NeuroD modulates opioid agonist-selective regulation of adult neurogenesis and contextual memory extinction. *Neuropsychopharmacology* **38**, 770–777 (2013).
 171. Tegeder, I. *et al.* G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res.* **63**, 1846–1852 (2003).

172. Yeager, M. P. & Colacchio, T. A. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Arch. Surg.* **126**, 454–456 (1991).
173. Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E. & Castanas, E. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **296**, 199–207 (1996).
174. Mathew, B. *et al.* Abstract C78: The mu opioid receptor regulates Lewis lung carcinoma tumor growth and metastasis. (2009).
175. Lin, X. *et al.* Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J.* **276**, 2022–2036 (2009).
176. Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J. Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* **37**, 79–88 (2003).
177. Hatsukari, I. *et al.* Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Res.* **27**, 857–864 (2007).